斜纹夜蛾信息素结合蛋白 SlitPBP4 的分子克隆、组织表达谱及结合特性分析

孙佳斌[1]，刘乃勇[2]，李双美[1]，闫 祺[1]，董双林[1,*]

（1. 南京农业大学植物保护学院，农业部作物病虫害监测与防控重点开放实验室，南京 210095；
2. 西南林业大学，云南省森林灾害预警与控制重点实验室，昆明 650224）

摘要：【目的】鉴定斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 新的信息素结合蛋白(pheromone binding protein, PBP)基因，明确其在斜纹夜蛾不同组织中的表达水平并探讨其功能。【方法】基于已报道的烟草天蛾 *Manduca sexta*、家蚕 *Bombyx mori*、君主斑蝶 *Danaus plexippus* 和庆网蛱蝶 *Melitaea cinxia* 4 种非夜蛾科昆虫 PBP4 同源基因的序列特点及与其他 PBP 基因在染色体上的相邻关系，通过分析实验室先前克隆到的斜纹夜蛾 PBP/GOBP 基因序列，克隆斜纹夜蛾 PBP4 同源基因；通过 RT-PCR 和 qPCR 技术测定该基因在斜纹夜蛾雌雄成虫不同组织中的表达水平；利用体外表达和荧光竞争性结合实验测定斜纹夜蛾 PBP4 蛋白对性信息素组分和植物气味物质的结合能力。【结果】在夜蛾科昆虫斜纹夜蛾中鉴定到首个 PBP4 基因，命名为 *SlitPBP4*(GenBank 登录号：MG356847)，cDNA 编码 210 个氨基酸，具有 N 末端信号肽、疏水性气味分子结合域及 6 个保守半胱氨酸等 PBP 的典型序列特征，其基因组 DNA 在保守位置也含有 2 个内含子；但和已报道的斜纹夜蛾 3 个 PBP 相比，PBP4 的 C 末端明显较长。*SlitPBP4* 在雄成虫腹部(生殖系统)极高表达，在雌雄成虫触角及其他组织中仅微弱表达或不表达。荧光竞争性结合实验结果表明，SlitPBP4 蛋白与被测定的信息素组分及植物气味物质均没有明显结合能力。【结论】报道了夜蛾科昆虫的首个 PBP4 基因，该基因可能主要参与雄虫生殖相关的生理过程而非嗅觉功能。

关键词：斜纹夜蛾；*SlitPBP4*；组织表达分析；原核表达；荧光竞争结合实验
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2018)06-0657-11

Molecular cloning, tissue expression profiling and binding characterization of the pheromone binding protein SlitPBP4 from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)

SUN Jia-Bin[1], LIU Nai-Yong[2], LI Shuang-Mei[1], YAN Qi[1], DONG Shuang-Lin[1,*] (1. Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract:【Aim】This study aims to identify the new pheromone binding protein (PBP) gene of *Spodoptera litura*, to clarify its tissue expression pattern and to explore its functions.【Methods】Based on the sequence characteristics of PBP4 homologues and their vicinity with other PBP genes on the chromosome in four non-noctuid species (*Manduca sexta*, *Bombyx mori*, *Danaus plexippus* and *Melitaea*

基金项目：国家重点研发计划项目(2017YFD0200900)；国家自然科学基金项目(31672350)
作者简介：孙佳斌，女，1993 年生，浙江绍兴人，硕士研究生，研究方向为昆虫化学生态，E-mail：18868801880@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sldong@njau.edu.cn
收稿日期 Received: 2017-12-21；接受日期 Accepted: 2018-01-22

cinxia) reported previously, a PBP4 gene was obtained from *S. litura* by analyzing *S. litura* PBP/GOBP genes previously cloned by our laboratory. The tissue expression patterns of this gene in male and female adults were determined by RT-PCR and qPCR. The binding properties of the recombinant PBP4 protein to sex pheromone components and plant odorants were measured by fluorescence competitive binding assay.【Results】The first PBP4 gene in Noctuidae was identified from *S. litura* and named *SlitPBP4*, which was deposited in GenBank under accession number MG356847. The cDNA sequence of *SlitPBP4* encodes 210 amino acids, with the typical sequence features of PBPs, including an N terminal signal peptide, several hydrophobic regions, six conserved cysteines, and two introns inserted at the conserved positions in the genomic DNA. However, SlitPBP4 has a C terminus much longer than that of the other three reported SlitPBPs. *SlitPBP4* showed predominantly high expression level in the male abdomen (the reproductive systems) but nearly undetectable in the antennae and other adult tissues. Fluorescence competitive binding assay showed that SlitPBP4 protein had no obvious binding ability to the tested pheromone components and plant odors.【Conclusion】The first PBP4 gene of noctuids was reported. *SlitPBP4* is likely to be involved primarily in the reproduction-related physiological processes in male adults, rather than the olfactory function of other reported PBP genes in noctuids.

Key words: *Spodoptera litura*; *SlitPBP4*; tissue expression; prokaryotic expression; fluorescence competitive binding assay

蛾类昆虫的性信息素通讯系统具有极高的灵敏性和种特异性,保证了同种雌雄两性个体在夜间可以准确识别、交配并避免种间杂交。信息素结合蛋白(pheromone binding protein, PBP)高浓度存在于雄蛾触角中,起到识别、结合和运送性信息素分子穿过感器淋巴液到达嗅觉神经树突膜表面受体的作用(Herbert *et al*., 2014),对于雄蛾识别和感受同种性信息素至关重要(Li and Prestwich, 1997)。PBP 隶属于昆虫气味结合蛋白(odorant binding protein, OBP)家族,第一个昆虫 PBP(也是第一个昆虫 OBP)于 1981 年在多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 雄虫触角中得到鉴定(Vogt and Riddiford, 1981)。在鳞翅目昆虫中,根据序列相似性和结合的气味分子种类,OBP 被分为 PBP 及 GOBP(general odorant binding protein)两类,前者被认为在性信息素的感受中起作用,后者则在一般气味(如寄主植物、食物等气味)感受中起作用。随着分子生物学及测序技术的发展,借助于转录组及基因组数据,很多种昆虫的 OBP 基因得以鉴定,如家蚕 *Bombyx mori*(Krieger *et al*., 1996)、欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*(Willett and Harrison, 1999)、舞毒蛾 *Lymantria dispar*(Plettner *et al*., 2000)、苹淡褐卷蛾 *Epiphyas postvittana*(Newcomb *et al*., 2002)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Xiu *et al*., 2008)和棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Guo *et al*., 2012)。而且,一种昆虫除具有 PBP 和 GOBP 两类 OBP 外,还含有大量的 OBP 同源蛋白(其他 OBP)。

就 PBP 基因的数量而言,鳞翅目不同科昆虫为 1~5 个不等。其中,螟蛾科是目前发现 PBP 基因数量最多的科,如亚洲玉米螟和欧洲玉米螟各有 5 个 PBP 基因(*PBP*1-5)(Allen and Wanner, 2011),二化螟有 4 个 PBP 基因(*PBP*1-4)(Cao *et al*., 2014);蚕蛾科的家蚕有 4 个 PBP 基因(*OBP*3-6)(Gong *et al*., 2009);天蛾科的烟草天蛾也有 4 个 PBP 基因(*PBP*1-4)(Vogt *et al*., 2015);但从小菜蛾 *Plutella xylostella* 基因组中仅找到 3 个 PBP 基因(*PBP*1-3)(You *et al*., 2013)。在其他非夜蛾科昆虫,如舞毒蛾(Plettner *et al*., 2000)、梨小食心虫 *Grapholita molesta*(Song *et al*., 2014)等,也鉴定到 2~3个 PBP 基因。在已公布基因组的蝶类昆虫中,君主斑蝶 *Danaus plexippus* 具有 3 个 PBP 基因(Zhan *et al*., 2011);红带袖蝶 *Heliconius melpomene* (Dasmahapatra *et al*., 2012)有 2 个 PBP 基因;庆网蛱蝶 *Melitaea cinxia*(Ahola *et al*., 2014)鉴定到 4 个 PBP 基因。显然,不同鳞翅目物种 PBP 的数量存在差异,但由于对这些基因功能的研究较少,尚难获得 PBP 基因的数量与性信息素或其他气味感受间的确定性关系。

夜蛾科是鳞翅目第一大科,迄今在小地老虎 *Agrotis ypsilon*(Gu *et al*., 2013)、棉铃虫 *H. armigera* (Zhang *et al*., 2011)、海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* (Legeai *et al*., 2011)和斜纹夜蛾 *S. litura*(Xiu *et*

al., 2008；杨芳等, 2010）等多种夜蛾的触角中鉴定到最多 3 个不同的 PBP 基因（*PBP*1, *PBP*2 和 *PBP*3），尚未有 PBP4 基因的报道，也暗示夜蛾科中可能的 PBP4 基因并不在触角中高表达。2017 年 8 月和 10 月，棉铃虫基因组数据（Pearce *et al.*, 2017）和斜纹夜蛾基因组数据（Cheng *et al.*, 2017）相继公布，相关文章亦未有对 PBP4 基因的描述。本研究基于已报道的烟草天蛾等 4 种非夜蛾科昆虫 PBP4 基因的序列特点及与其他 PBP 基因在染色体上的相邻关系，通过比对实验室先前克隆到的斜纹夜蛾 PBP/GOBP 基因序列（Liu *et al.*, 2015），鉴定了斜纹夜蛾的 PBP4 同源基因，然后通过 RT-PCR 和 qPCR 分析其组织表达谱，进而利用体外表达、荧光竞争性结合实验等对该基因的功能进行了初步探讨。

1　材料与方法

1.1　试虫及组织收集

斜纹夜蛾幼虫在室内用人工饲料（朱丽梅等, 2001）饲养，饲养条件为温度为 26 ± 1℃、相对湿度为 65% ± 5%、光周期 14L∶10D。蛹期分雌雄，成虫雌雄分开饲养，喂以 10% 的蜂蜜水。

在组织表达谱分析试验中，收集 2 日龄暗期第 6 小时的雌雄成虫的触角、头（去除触角）、胸、腹、足、翅等 6 个组织，迅速装入含有 Trizol 的 2 mL 离心管中。每个组织收集 3 个重复，每个重复的数量分别为触角 100 根、头（去除触角）20 个、胸 10 个、腹 5 个、足 60 个、翅 10 个。另收集雄虫生殖系统和除去生殖系统的腹部组织各 5 个。所有组织收集后 －80℃保存。

1.2　主要试剂

RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen（美国）公司；反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit、定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq 购自 TaKaRa（大连）公司；DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen（美国）公司；2 × Taq Master Mix 和 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 均购自诺唯赞（南京）生物科技有限公司；pEASY-T3 克隆试剂盒、大肠杆菌 *Escherichia coli trans*-T1 感受态细胞、2k DNA Marker 和 6 × DNA Loading Buffer 购自全式金（北京）生物科技有限公司；BL21（DE3）感受态细胞购自北京鼎国公司；T4 DNA 连接酶及快速限制性内切酶（*Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ）购自 Fermentas 公司；肠激酶购自金斯瑞（南京）生物科技有限公司。所用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3　斜纹夜蛾组织总 RNA 提取和 cDNA 的合成

斜纹夜蛾雌雄成虫触角、头部（去除触角）、胸部、腹部、足和翅的总 RNA 使用 Trizol 提取，方法依照说明书操作。总 RNA 质量通过琼脂糖凝胶电泳检测，浓度用 NanoDrop 1000 测定。取 2 μg 总 RNA，以 OligdT 为引物合成 cDNA 第 1 链，作为 RT-PCR 和 qPCR 分析的模板。

1.4　基因鉴定

通过分析已报道的烟草天蛾、家蚕、君主斑蝶和庆网蛱蝶这 4 种昆虫不同 PBP 基因在染色体上的位置关系，发现 PBP4 基因与其他 3 个 PBP 基因和 GOBP2 基因相邻分布，据此实验室先前克隆了斜纹夜蛾 PBP/GOBP 基因序列（GenBank 登录号：KJ956693）（Liu *et al.*, 2015）；在此基础上，通过分析上述 4 种昆虫 PBP 基因的序列特点并比对斜纹夜蛾 PBP/GOBP 基因序列，获得斜纹夜蛾 PBP4 同源基因的基因组 DNA 序列。

1.5　PBP4 基因同源性分析、疏水区域预测和进化树构建

利用基因探索者软件将核苷酸序列翻译成蛋白序列；利用 ExPASy 软件中的 Compute pI /Mw（http：//web. expasy. org/protparam/）程序预测蛋白的分子量和等电点；利用 SignalP 4. 1 软件预测（http：//www. cbs. dtu. dk/services/SignalP/）SlitPBP4 信号肽序列；利用 ExPASy 软件中的 ProtScale（http：//web. expasy. org/protscale/）预测 SlitPBP1 －4 疏水区域。采用 DNAMAN 软件分析斜纹夜蛾 PBP4 与斜纹夜蛾 PBP1 －3 及 GOBP1 －2 基因氨基酸序列的同源性；利用 MEGA5. 0 软件的邻接法（抽样次数 1 000），对斜纹夜蛾所有已报道的 OBP（Gu *et al.*, 2015）及其他代表性鳞翅目昆虫的 PBP 和 GOBP 构建系统进化树。

1.6　斜纹夜蛾 PBP4 基因组织表达谱分析

RT-PCR 反应体系 25 μL：2 × Taq Mix 12. 5 μL，cDNA 模板 20 ng，正反向引物（10 pmol/μL）各 1 μL，加无 RNA 酶水至 25 μL。反应程序：94℃ 3 min；94℃ 30 s，59℃ 30 s，72℃ 30 s，30 个循环；72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。以斜纹夜蛾 GAPDH 基因作为内参基因，进行 3 次生物学重复。qPCR 采用荧光染料 SYBR Green II，使用 96 孔板在 ABI 7500 定量 PCR 仪中测定。反应体系（20 μL）：SYBR Green PCR Master Mix 10 μL，上下游引物（10 pmol/μL）各 0. 4 μL，

ROX Reference Dye II 0.4 μL，cDNA 模板 2.0 μL 和无 RNA 酶水 6.8 μL。反应程序：95℃ 30 s；95℃ 5 s，60℃ 34 s，40 个循环。所用引物序列见表 1。采用双内参基因 *SlitGAPDH*（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene，GenBank 登录号：HQ012003.2）和 *SlitEF*（elongation factor gene，GenBank 登录号：DQ192234.1）进行相对表达量计算，进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$值法计算目的基因的相对表达量（Livak and Schmittgen，2001）。采用 SPSS17.0 的独立样本 *t* 检验，分析不同组织间的表达量差异。

1.7 斜纹夜蛾 PBP4 基因表达载体的构建

使用 SignalP4.1 软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测斜纹夜蛾 PBP 信号肽。基于预测结果将信号肽相应的核酸序列从 ORF 区域去除，依据去信号肽后的基因序列设计特异性表达引物，并在引物两端分别添加酶切位点 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ（表 1）。用高保真酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增，体系和程序见说明书。扩增结束后采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化，后连接到 pEASY-T3 载体上，然后转入大肠杆菌感受态细胞 *Trans*-T1 内，并送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。对测序正确的重组质粒进行扩大培养并提取质粒。内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 对 pET-30a（+）载体和 pEASY-T3 载体进行双酶切，并进行电泳回收。使用 T4 DNA 连接酶对回收的基因片段和 pET-30a（+）载体进行连接，并将连接产物选用转入 BL21（DE3）感受态细胞内，并送交公司测序。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列（5′-3′）Primer sequences	用途 Purposes
SlitPBP4-F	CCAGACGGAGATGGACATCAAGG	RT-PCR
SlitPBP4-R	CCATGTCTGTCACTTGGTCCGG	
GAPDH-F	CAAAATCGGTATCAACGGTTTCGG	
GAPDH-R	GTAGGAAGGATCGTAAGCGTCAAGG	
SlitPBP4-qF	AAGTGACAGACATGGTTGAGG	qPCR
SlitPBP4-qR	AAGAGGCAAGTCGTCTGAAAT	
EF-qF	ACGCTCCCGGACACAGAGAT	
EF-qR	GCTCACGGGTCTGTCCGTTC	
GAPDH-qF	CGTGTTCCTGTTGCTAAC	
GAPDH-qR	CTTGACCTTCTGCTTGATAG	
SlitPBP4-vF	GGATCCAAGAACGAGGTTAGCGTGCTG	载体构建 Vector construction
SlitPBP4-vR	CTCGAGCTATCTACAATAAACTCTTCTT	

下划线为限制性酶切位点。The restriction sites are underlined.

1.8 斜纹夜蛾 PBP4 的表达与纯化

取 50 μL 测序正确的菌液于 5 mL LB 培养基中过夜培养。次日将 5 mL 菌液转入 500 mL LB 培养基中 200 r/min 37℃ 培养，当菌液的 OD_{600} 值达到 0.6～0.8 时加入 IPTG，使其终浓度为 1 mmol/L，200 r/min 37℃继续培养 6 h。收集细胞，并在冰浴条件下对细胞进行超声波破碎，通过 SDS-PAGE 检测目的蛋白的可溶性表达情况。因重组蛋白以包涵体的形式存在，故采用尿素变性包涵体的方法进行纯化。纯化步骤及所需缓冲液见填料 Ni Sepharose High Performance 说明书。纯化后的蛋白采用尿素梯度进行复性，复性后的蛋白用肠激酶切除 His-tag 标签，经亲和层析柱在此纯化后，SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的纯度。最后，透析除盐，含目的蛋白溶液用低温冷冻干燥机冻干。-80℃保存备用。

1.9 荧光竞争性结合测定

采用荧光竞争性结合测定法（fluorescence competitive binding assay）测定不同性信息素组分和植物气味物质与 SlitPBP4 的亲和力。采用 1-NPN 作为荧光探针，选取部分性信息素组分和植物气味物质进行测定。仪器参数为：Ex = 337 nm，Em = 420 nm。所用气味物质及其来源见表 2。

表 2　荧光竞争性结合试验所用气味物质
Table 2　Odorant compounds used in the competitive fluorescence binding assay

气味物质 Odorant compounds	作用 Use	来源 Source
*Z*9,*E*11-14:Ac	性信息素主组分 Main sex pheromone	ShinEtsu, Japan
*Z*9-14:OH	性信息素类似物 Sex pheromone analogue	
橙花叔醇 Nerolidol	常见植物挥发物 Common plant volatiles	Sigma-Aldrich, USA
苯乙醇 Phenethyl alcohol		
月桂酸 Lauric acid		
β-紫罗兰酮 β-Ionone		
苯甲醛 Benzaldehyde		
法尼烯 Farnesene	植物挥发油组分及蚜虫报警信息素 Plant essential oil and aphid alarm pheromone (Bowers *et al*., 1972)	
油酸 Oleic acid	可能的抑卵信息素 Possible oviposition deterrents (Li *et al*., 2004)	
硬脂酸 Stearic acid		
棕榈酸 Palmitic acid		
豆蔻酸 Myristic acid		

使用酶标仪进行荧光竞争性结合试验。首先测定 PBP4 与 1-NPN 的结合常数：在浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（pH 7.4）中加入 PBP4 蛋白，使其浓度为 2 μmol/L，然后每次加入 1-NPN 溶液（0.5 mmol/L）1 μL，充分混合均匀，静置 2 min 后测定和记录其荧光值，至 1-NPN 终浓度 2 μmol/L。其次，测定斜纹夜蛾性信息素结合蛋白与不同气味物质的亲和能力：在 250 μL 浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（pH 7.4）中加入蛋白和 1-NPN 使它们终浓度均为 2 μmol/L。在反应液中逐次加入终浓度为 0～20 μmol/L 的气味物质溶液，充分混合均匀，静置 2 min 后测定并记录其荧光值。

根据气味物质不同浓度下的荧光值计算 IC_{50} 值（荧光值降到不加配基荧光值一半时的配基浓度），进而计算蛋白与气味物质的结合常数（Ki）。$Ki = IC_{50}/(1 + C_{1\text{-NPN}}/K_{1\text{-NPN}})$。其中，$C_{1\text{-NPN}}$ 为未结合 1-NPN 浓度；$K_{1\text{-NPN}}$ 为 PBP/1-NPN 复合物的结合常数。对于植物气味物质，一般认为 Ki 值（单位 μmol/L）小于 10 结合能力较强，介于 10～20 之间结合能力较弱，大于 20 没有结合能力；对于性信息素组分，Ki 值小于 2 结合能力较强，介于 2～4 之间较弱，大于 4 没有结合能力。

2　结果

2.1　斜纹夜蛾 PBP4 基因的鉴定及其序列分析

利用不同物种间同源基因的在序列及染色体上位置的相对保守性，对实验室早先克隆的斜纹夜蛾 PBP/GOBP 基因序列进行序列分析，获得了斜纹夜蛾的 PBP4 同源基因的基因组及 cDNA 全长序列，命名为 *SlitPBP4*（GenBank 登录号：MG356847）。

SlitPBP4 的开放阅读框长 633 bp，共编码 210 个氨基酸，具有昆虫 PBP 典型的序列特征（图 1）：N 末端 20 个左右氨基酸的信号肽、保守的 6 个半胱氨酸残基和保守的内含子数量及插入位置（内含子 1 插入到两个氨基酸之间，内含子 2 插入到编码同一个氨基酸的碱基间）。但和其他 3 个斜纹夜蛾 PBP 相比，SlitPBP4 的 C 末端多 40 个左右的氨基酸，且具有较强的亲水性（图 2）。去除信号肽后，SlitPBP4 的蛋白分子量大小为 22.4 kD，等电点为 8.48。

2.2　SlitPBP4 的进化分析

将 SlitPBP4 和已报道的斜纹夜蛾其他 OBP 及部分鳞翅目昆虫的 PBP 和 GOBP 构建系统进化树（图 3）。结果显示，鳞翅目昆虫 PBP/GOBP 分成 PBP 和 GOBP 两个明显的分支，而 PBP 又进一步分为 3 个小支（分别为 PBP1，2 和 3），GOBP 分为 2 个小支（分别为 GOBP1 和 2）。SlitPBP4 与 PBP1－3 及 GOBP1－2 较近，同其他几种昆虫的 PBP4（或 OBP）一起归为 PBP4 分支。

2.3　*SlitPBP4* 组织表达谱分析

利用 RT-PCR 和 qPCR 分别检测了 *SlitPBP4* 在雌、雄成虫不同组织中的表达水平（图 4）。RT-PCR 结果显示，*SlitPBP4* 在雄成虫腹部高表达，在其他成虫组织中不表达。qPCR 结果和 RT-PCR 结果基本一致，同样为在雄成虫腹部高表达，同时在雌成虫触角中有微弱表达，为雄成虫腹部中表达量的 3.28%。进一步对雄成虫腹部的 RT-PCR 检测结果显示，*SlitPBP4* 只在生殖系统表达而在非生殖系统的组织不表达。

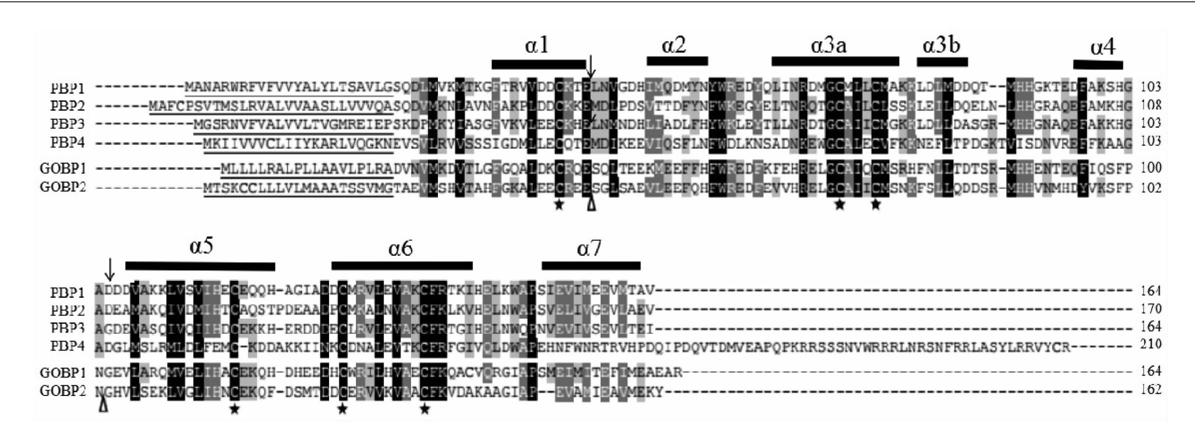


图 1 斜纹夜蛾 4 个 PBP 与 2 个 GOBP 的氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment among four PBPs and two GOBPs of *Spodoptera litura*

蛋白的 GenBank 登录号 GenBank accession numbers of proteins: PBP1, AAY21255.1; PBP2, AAZ22339.1; PBP3, AIS72934.1; PBP4, MG356847; GOBP1, ABM54823.1; GOBP2, AKI87961.1. 6 个保守的半胱氨酸位点用五角星标出;信号肽用下划线标识;箭头和三角形分别表示 PBP1 -4 和 GOBP1 -2 的 2 个内含子插入位置;螺旋结构用黑粗线标出。Six conserved cysteine residues are indicated by pentagrams. The signal peptide sequences are underlined. Sites of two introns are marked with arrows (for PBP1 -4) and triangle (for GOBP1 -2) on the sequence. The α-helixes are marked with thick black lines.

图 2 SlitPBP1 -4 的疏水区域预测

Fig. 2 Prediction of hydrophobic regions of SlitPBP1 -4

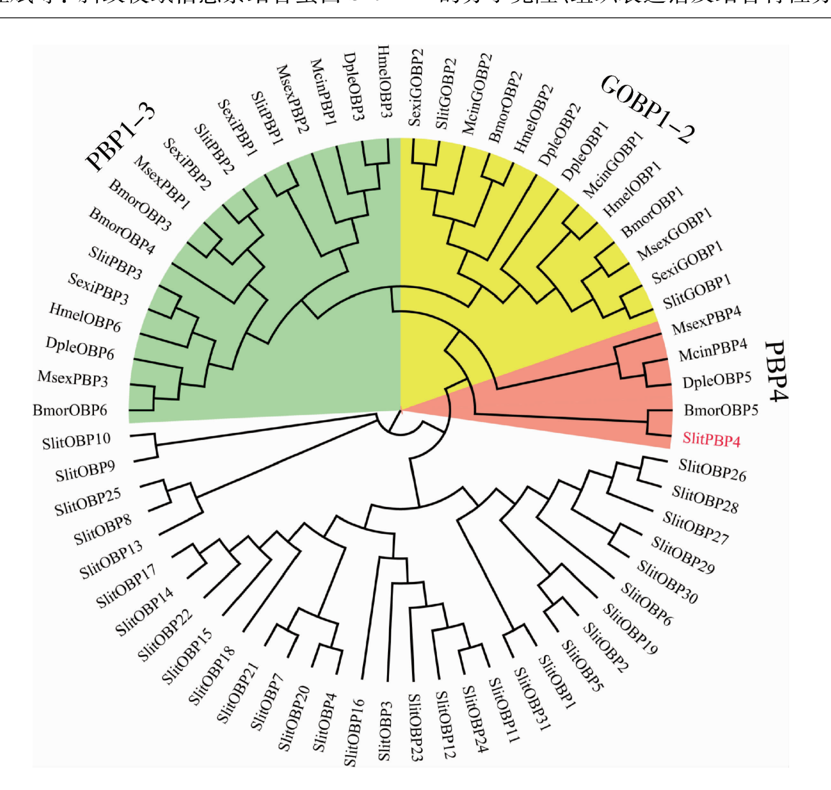


图 3 基于氨基酸序列构建的斜纹夜蛾 OBP 及其他代表性鳞翅目昆虫 PBP/GOBP 的系统进化树(邻接法，1 000 次重复)

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of SlitOBPs and other lepidopteran PBP/GOBPs (neighbor-joining method, 1 000 replicates)

蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers：家蚕 *Bombyx mori* (BmorOBP1, CAA64444.1; BmorOBP2, CAA64445.1; BmorOBP3, NP_001037494.1; BmorOBP4, XP_012545845.1; BmorOBP5, Gong *et al*. (2009); BmorOBP6, NP_001077095.1)；烟草天蛾 *Manduca sexta* [MsexPBP1, AAA29326.1; MsexPBP2, AAF16710.1; MsexPBP3, AAF16703.1; MsexPBP4, Vogt *et al*. (2015)]；斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* [SlitPBP1, AAY21255.1; SlitPBP2, AAZ22339.1; SlitPBP3, AIS72934.1; SlitGOBP1, ABM54823.1; SlitGOBP2, AKI87961.1; SlitOBP1 – SlitOBP31, Feng *et al*. (2012), Gu *et al*. (2015)]；甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (SexiPBP1, ABK41046.1; SexiPBP2, AAS55551.2; SexiPBP3, ACY78413.1; SexiGOBP1, ACY78412.1; SexiGOBP2, AKI87961.1)；君主斑蝶 *Danaus plexippus* [DpleOBP1 – 3, DpleOBP5 – 6, Zhan *et al*. (2011)]；红带袖蝶 *Heliconius melpomene* [HmelOBP1 – 3, HmelOBP6, Dasmahapatra *et al*. (2012)]；庆网蛱蝶 *Melitaea cinxia* [McinGOBP1 – 2, McinPBP1, McinPBP4, Ahola *et al*. (2014)].

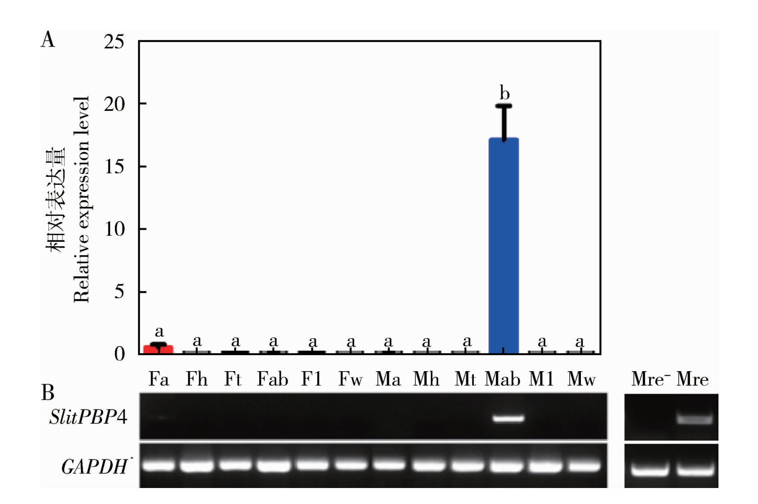


图 4 *SlitPBP4* 在斜纹夜蛾雌雄成虫各组织中表达量的 qPCR (A)和 RT-PCR (B)分析

Fig. 4 qPCR (A) and RT-PCR (B) analyses of *SlitPBP4* gene in different adult tissues of *Spodoptera litura*

Fa：雌虫触角 Female antenna；Fh：雌虫头部(去触角)Female head without antennae；Ft：雌虫胸部 Female thorax；Fab：雌虫腹部 Female abdomen；Fl：雌虫足 Female leg；Fw：雌虫翅 Female wing；Ma：雄虫触角 Male antenna；Mh：雄虫头部(去触角)Male head without antennae；Mt：雄虫胸部 Male thorax；Mab：雄虫腹部 Male abdomen；Ml：雄虫足 Male leg；Mw：雄虫翅 Male wing；Mre^-：除去生殖系统的雄虫腹部 Male abdomen without reproductive system；Mre：雄虫生殖系统 Male reproductive system. 图中数据为平均值 ± 标准差(n = 3)；柱上不同字母代表差异显著($P < 0.05$, t 检验)。Values are mean ± *SD* of three biological replicates. Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, t-test).

2.4 SlitPBP4 与气味物质的亲和力分析

构建原核表达载体 pET/SlitPBP4 后，在大肠杆菌中进行重组蛋白的大量表达、纯化，经酶切后得到 SlitPBP4 蛋白，大小为 22 kD 左右，与预测分子量一致(图 5)。首先测定了 SlitPBP4 蛋白与荧光探针 1-NPN 间的结合能力，结果表明两者间具有较好的结合能力(Kd = 9.60 ± 0.61 μmol/L)且具有饱和效应(图 6：A)，说明可以通过荧光竞争性结合实验测定 SlitPBP4 与不同气味物质的结合能力。但测定显示，SlitPBP4 与几种常见的植物气味物质和斜纹夜蛾性信息素组分均没有明显的结合能力(图 6：B)，与可能的 4 种抑卵信息素组分也没有结合能力(结合曲线未列出)。

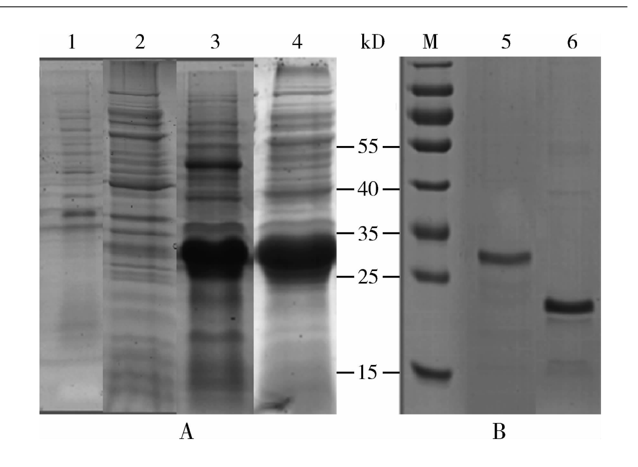


图 5 重组 pET/SlitPBP4 的表达(A)及纯化产物(B)的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the recombinant pET/SlitPBP4 (A) and purified product (B)

M：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker；1：未加 IPTG 诱导的细菌细胞 Bacterial cells before IPTG induction；2：IPTG诱导 6 h 后的上清 Supernatant after IPTG induction for 6 h；3：IPTG 诱导 6 h 后的沉淀 Precipitate after IPTG induction for 6 h；4：超声破碎后的沉淀 Precipitate after ultrasonication；5：纯化后的蛋白 Purified protein；6：酶切去除标签后的蛋白 Purified protein after cleavage of His-tag by enterokinase.

3 结论与讨论

近年来，在一些非夜蛾科昆虫中已报道有 3 个以上的 PBP 基因，但在夜蛾科昆虫中，通过同源克隆、转录组测序等手段，每种昆虫中只发现了最多 3 个不同的 PBP 基因(*PBP*1 − 3)，由于缺少基因组序列数据，夜蛾科昆虫 PBP 基因的确切数量不得而知。本研究在实验室前期鉴定到斜纹夜蛾 3 个 PBP 基因和 2 个 GOBP 基因并克隆获得 PBP/GOBP 基因序列的基础上，通过分析鳞翅目昆虫 PBP/GOBP 基因在染色体上的相邻分布特点，成功从斜纹夜蛾中鉴定到 SlitPBP4 基因，这也是夜蛾科第一个 PBP4 基因的报道。在本文撰写期间，棉铃虫和斜纹夜蛾基因组序列测序相继完成并公布(Pearce *et al*., 2017; Cheng *et al*., 2017)，我们对公布的基因组序列进行分析，也证实了两种夜蛾昆虫中 PBP4 的存在。该基因的鉴定，为夜蛾科昆虫 PBP/GOBP 的进化及功能分化研究，提供了重要依据。

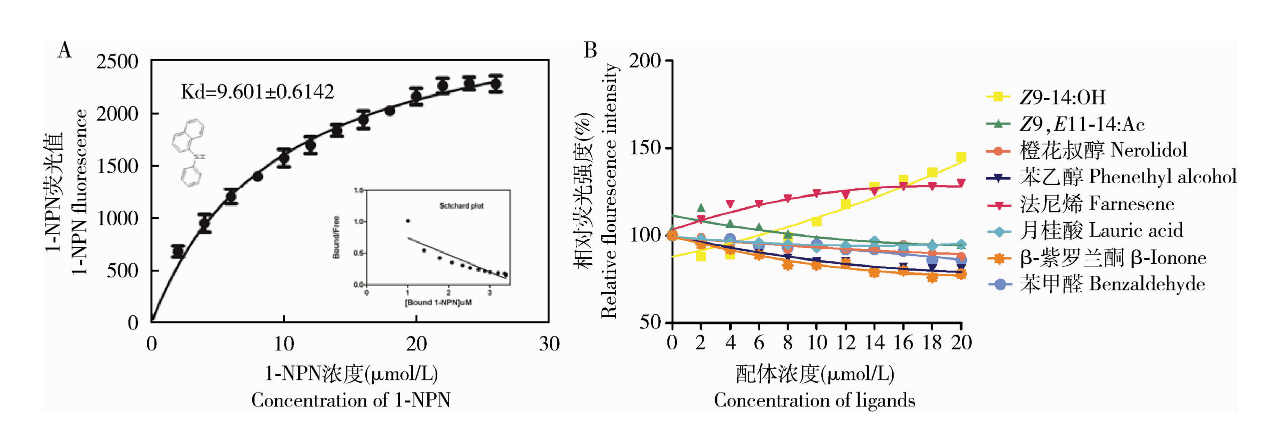


图 6 SlitPBP4 与荧光探针 1-NPN(A)及不同气味物质(B)的结合曲线

Fig. 6 Binding curves of SlitPBP4 to 1-NPN (A) and different odorant compounds (B)

SlitPBP4 编码的蛋白具有鳞翅目 PBP/GOBP 的典型特征，包括 N 末端 20 个左右氨基酸组成的信号肽、6 个保守的半胱氨酸、基因组 DNA 含有 3 个外显子和 2 个内含子；进化树分析也表明，SlitPBP4 与 PBP/GOBP 家族靠近，因此我们认为 SlitPBP4 及其同源 PBP4 属于 PBP/GOBP 家族中一个新的亚家族。我们将该基因命名为 PBP 基因而非 GOBP 基因，主要有以下原因：其一，从基因组 DNA 的序列特征看，*SlitPBP4* 中 2 个内含子的插入位点与斜纹夜蛾其他 3 个 PBP 基因相同(第 1 个内含子在两个氨

基酸间，第 2 个内含子在一个氨基酸内的碱基间），而不同于 2 个 GOBP 基因（2 个内含子均在两个氨基酸间）；其二，该基因在染色体上与其他 PBP 基因临近分布，与 2 个 GOBP 基因则较远；另外，在非夜蛾科昆虫烟草天蛾（Vogt *et al*., 2015）和庆网蛱蝶（Dasmahapatra *et al*., 2012）中已报道的同源基因均命名为 PBP 基因。尽管如此，SlitPBP4 同其他 3 个斜纹夜蛾 PBP 间仍存在较大差异，首先是氨基酸序列间的一致性（identity）较低（SlitPBP4 和 SlitPBP1 – 3 分别为 15%，17% 和 18%），其次是 SlitPBP4 的 C 末端明显多出 40 个左右的氨基酸，且该段序列的亲水性较强。因此，SlitPBP4 与其他 3 个 PBP 在功能上可能存在较大差异。

为了探讨 SlitPBP4 的功能，我们首先进行了基因的组织表达谱分析。结果发现，与其他 3 个斜纹夜蛾 PBP 基因的触角高表达特点（Liu *et al*., 2013）不同，*SlitPBP4* 只在雌虫触角中微量表达，而在雄性腹部极高表达。在非夜蛾科昆虫中，PBP4 基因在家蚕和君主斑蝶中的同源基因 *BmorOBP5* 和 *DpleOBP5* 在触角、幼虫、蛹等的 EST 转录组中均未被检测到，说明这些基因在这些组织（或虫态）中没有表达或表达量极低；在家蚕中，qPCR 结果显示 *BmorOBP5* 在触角中只有极低的表达（Gong *et al*., 2009）。在烟草天蛾触角等 4 个不同组织的转录组中，*MsexPBP4* 仅在马氏管中有极低的表达（Vogt *et al*., 2015）。这些结果说明，PBP4 基因在夜蛾科甚至整个鳞翅目昆虫触角中的表达量都很低，因此其主要功能并非嗅觉。

鳞翅目昆虫 PBP 基因除在触角中高表达外，在其他一些组织如性信息素腺体、翅、喙、下唇须、足中也有少量表达（Gu *et al*., 2013；Sun *et al*., 2013），但尚没有在雄蛾腹部特异或显著高表达的报道，*SlitPBP4* 的雄蛾生殖系统高表达特点暗示其在雄性生殖相关的生理过程中起作用。在其他 OBP 基因中，有关腹部中高表达的例子常有报道，如斜纹夜蛾 OBP19，OBP20 和 OBP33 基因（Gu *et al*., 2015）、棉铃虫 OBP10 基因（Sun *et al*., 2012）。其中棉铃虫 OBP10 基因不仅在两性触角中表达，同时在雄虫精液中高度表达；进一步的研究表明，棉铃虫 OBP10 蛋白在交配过程中由雄虫传递给雌虫，然后附着在卵表面被雌虫产出体外，推测其可能起到结合并释放抑卵信息素，抑制其他雌性个体在本区域产卵行为以降低后代幼虫对有限食物资源的竞争（Sun *et al*., 2012）。对于 SlitPBP4 是否也具有类似的功能，我们也进行了探讨。利用 Western blot 技术对交配前后雌雄虫生殖系统 PBP4 蛋白进行检测，没有发现交配后雌虫腹部中 PBP4 蛋白的明显增加，免疫组化试验也未在交配后雌虫所产卵的表面检测到 PBP4（结果未列出）。此外，鉴于 SlitPBP4 基因在雌虫触角中也有少量的表达，我们利用原核表达技术在体外进行该蛋白的大量表达，然后利用荧光竞争性结合实验对部分常见植物气味物质、斜纹夜蛾性信息素主组分及可能的抑卵信息素组分进行了结合能力测定，结果发现 SlitPBP4 和这些化合物均没有明显的结合能力，说明 SlitPBP4 在这些气味物质的感受中不起作用，但不排除在其他气味物质感受中的可能作用。SlitPBP4 的雄蛾生殖系统高表达特点，暗示其在雄性生殖相关的生理过程中起重要作用，有待进一步深入研究。

参考文献（References）

Ahola V, Lehtonen R, Somervuo P, Salmela L, Koskinen P, Rastas P, Välimäki, Niko, Paulin L, Kvist J, Wahlberg N, Tanskanen J, Hornett EA, Ferguson LC, Luo S, Cao ZJ, de Jong MA, Duplouy A, Smolander OP, Vogel H, McCoy RC, Qian K, Chong SW, Zhang Q, Ahmad F, Haukka JK, Joshi A, Salojärvi J, Wheat CW, Grosse-Wilde E, Hughes D, Katainen R, Pitkänen E, Ylinen J, Waterhouse RM, Turunen M, Vähärautio A, Ojanen SP, Schulman AH, Taipale Mi, Lawson D, Ukkonen E, Mäkinen V, Goldsmith MR, Holm L, Auvinen P, Frilander MJ, Hanski I, 2014. The Glanville fritillary genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. *Nat. Commun*., 5: 4737.

Allen JE, Wanner KW, 2011. Asian corn borer pheromone binding protein 3, a candidate for evolving specificity to the 12-tetradecenyl acetate sex pheromone. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 41(3): 141 – 149.

Bowers WS, Nault LR, Webb RE, Dutky SR, 1972. Aphid alarm pheromone: isolation, identification, synthesis. *Science*, 177(4054): 1121 – 1122.

Cao DP, Liu Y, Wei JJ, Liao XY, Walker WB, Li JH, Wang GR, 2014. Identification of candidate olfactory genes in *Chilo suppressalis* by antennal transcriptome analysis. *Int. J. Biol. Sci*., 10(8): 846 – 860.

Cheng T, Wu J, Wu Y, Chilukuri RV, Huang L, Yamamoto K, Feng L, Li W, Chen Z, Guo H, Liu J, Li S, Wang X, Peng L, Liu D, Guo Y, Fu B, Li Z, Liu C, Chen Y, Tomar A, Hilliou F, Montagne N, Jacquin-Joly E, d'Alencon E, Seth RK, Bhatnagar RK, Jouraku A, Shiotsuki T, Kadono-Okuda K, Promboon A, Smagghe G, Arunkumar KP, Kishino H, Goldsmith MR, Feng Q, Xia Q, Mita K, 2017. Genomic adaptation to polyphagy and insecticides in a major East Asian noctuid pest. *Nat. Ecol. Evol*., 1(11): 1747 – 1756.

Dasmahapatra KK, Walters JR, Briscoe AD, Davey JW, Whibley A, Nadeau NJ, Zimin AV, Hughes DST, Ferguson LC, Martin SH, Salazar C, Lewis JJ, Adler S, Ahn SJ, Baker DA, Baxter SW, Chamberlain NL, Chauhan R, Counterman BA, Dalmay T, Gilbert LE, Gordon K, Heckel DG, Hines HM, Hoff J, Holland PWH, Jacquin-Joly E, Jiggins FM, Jones RT, Kapan DD, Kersey P, Lamas G, Lawson D, Mapleson D, Maroja LS, Martin A, Moxon S, Palmer WJ, Papa R, Papanicolaou A, Pauchet Y, Ray DA, Rosser N, Salzberg SL, Supple MA, Surridge A, Tenger-Trolander A, Vogel H, Wilkinson PA, Wilson D, Yorke JA, Yuan F, Balmuth AL, Eland C, Gharbi K, Thomson M, Gibbs RA, Han Y, Jayaseelan JC, Kovar C, Mathew T, Muzny DM, Ongeri F, Pu LL, Qu JX, Thornton RL, Worley KC, Wu YQ, Linares M, Blaxter ML, Ffrench-Constant RH, Joron M, Kronforst MR, Mullen SP, Reed RD, Scherer SE, Richards S, Mallet J, McMillan WO, Jiggins CD, 2012. Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature*, 487(7405): 94 – 98.

Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Xia QY, Xiang ZH, 2009. The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10(1): 332.

Gu SH, Zhou JJ, Gao S, Wang DH, Li XC, Guo YY, Zhang YJ, 2015. Identification and comparative expression analysis of odorant binding protein genes in the tobacco cutworm *Spodoptera litura*. *Sci. Rep.*, 5: 13800.

Gu SH, Zhou JJ, Wang GR, Zhang YJ, Guo YY, 2013. Sex pheromone recognition and immunolocalization of three pheromone binding proteins in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(3): 237 – 251.

Guo H, Huang LQ, Pelosi P, Wang CZ, 2012. Three pheromone-binding proteins help segregation between two *Helicoverpa* species utilizing the same pheromone components. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 42(9): 708 – 716.

Herbert V, Ana M, Zhou JJ, Andrés Q, 2014. Ligand binding and homology modelling of insect odorant-binding proteins. *Physiol. Entomol.*, 39(3): 183 – 198.

Krieger J, von Nickisch-Rosenegk E, Mameli M, Pelosi P, Breer H, 1996. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 26(3): 297 – 307.

Legeai F, Malpel S, Montagné N, Monsempes C, Cousserans F, Merlin C, François MC, Maibeche-Coisne M, Gavory F, Poulain J, Jacquin-Joly E, 2011. An expressed sequence tag collection from the male antennae of the Noctuid moth *Spodoptera littoralis*: a resource for olfactory and pheromone detection research. *BMC Genomics*, 12: 86.

Li F, Prestwich GD, 1997. Expression and characterization of a lepidopteran general odorant binding protein. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27(5): 405 – 412.

Li GQ, Ishikawa Y, 2004. Oviposition deterrents in larval frass of four *Ostrinia* species fed on an artificial diet. *J. Chem. Ecol.*, 30(7): 1445 – 1456.

Liu NY, Liu CC, Dong SL, 2013. Functional differentiation of pheromone-binding proteins in the common cutworm *Spodoptera litura*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 165(2): 254 – 262.

Liu NY, Yang K, Liu Y, Xu W, Anderson A, Dong SL, 2015. Two general-odorant binding proteins in *Spodoptera litura* are differentially tuned to sex pheromones and plant odorants. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 180: 23 – 31.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(– Delta Delta C (T)) method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Newcomb RD, Sirey TM, Rassam M, Greenwood DR, 2002. Pheromone binding proteins of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) are encoded at a single locus. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 32(11): 1543 – 1554.

Pearce SL, Clarke DF, East PD, Elfekih S, Gordon KHJ, Jermiin LS, McGaughran A, Oakeshott JG, Papanikolaou A, Perera OP, Rane RV, Richards S, Tay WT, Walsh TK, Anderson A, Anderson CJ, Asgari S, Board PG, Bretschneider A, Campbell PM, Chertemps T, Christeller JT, Coppin CW, Downes SJ, Duan G, Farnsworth CA, Good RT, Han LB, Han YC, Hatje K, Horne I, Huang YP, Hughes DST, Jacquin-Joly E, James W, Jhangiani S, Kollmar M, Kuwar SS, Li S, Liu NY, Maibeche MT, Miller JR, Montagne N, Perry T, Qu J, Song SV, Sutton GG, Vogel H, Walenz BP, Xu W, Zhang HJ, Zou Z, Batterham P, Edwards OR, Feyereisen R, Gibbs RA, Heckel DG, McGrath A, Robin C, Scherer SE, Worley KC, Wu YD, 2017. Genomic innovations, transcriptional plasticity and gene loss underlying the evolution and divergence of two highly polyphagous and invasive *Helicoverpa* pest species. *BMC Biol.*, 15(1): 63.

Plettner E, Lazar J, Prestwich EG, Prestwich GD, 2000. Discrimination of pheromone enantiomers by two pheromone binding proteins from the gypsy moth *Lymantria dispar*. *Biochemistry*, 39(30): 8953 – 8962.

Song YQ, Dong JF, Qiao HL, Wu JX, 2014. Molecular characterization, expression patterns and binding properties of two pheromone-binding proteins from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck). *J. Integr. Agr.*, 13(12): 2709 – 2720.

Sun MJ, Liu Y, Wang GR, 2013. Expression patterns and binding properties of three pheromone binding proteins in the diamondback moth, *Plutella xyllotella*. *J. Insect Physiol.*, 59(1): 46 – 55.

Sun YL, Huang LQ, Pelosi P, Wang CZ, 2012. Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species. *PLoS ONE*, 7(1): e30040.

Vogt RG, Grosse-Wilde E, Zhou JJ, 2015. The Lepidoptera odorant binding protein gene family: gene gain and loss within the GOBP/PBP complex of moths and butterflies. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 62: 142 – 153.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161 – 163.

Willett CS, Harrison RG, 1999. Pheromone binding proteins in the European and Asian corn borers: no protein change associated with pheromone differences. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29(3): 277 – 284.

Xiu WM, Zhou YZ, Dong SL, 2008. Molecular characterization and expression pattern of two pheromone-binding proteins from *Spodoptera litura* (Fabricius). *J. Chem. Ecol.*, 34(4): 487–498.

Yang F, He P, Dong SL, 2010. Melecular identification and evolutionary analysis of pheromone binding protein 3 gene in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius). *J. Nanjing Agric. Univ.*, 33(5): 65–70. [杨芳, 贺鹏, 董双林, 2010. 斜纹夜蛾信息素结合蛋白 3 基因的分子鉴定及进化分析. 南京农业大学学报, 33(5): 65–70]

You MS, Yue Z, He WY, Yang XH, Yang G, Xie M, Zhan DL, Baxter SW, Vasseur L, Gurr GM, Douglas CJ, Bai JL, Wang P, Cui K, Huang SG, Li XC, Zhou Q, Wu ZY, Chen QL, Liu CH, Wang B, Li XJ, Xu XF, Lu CX, Hu M, Davey JW, Smith SM, Chen MS, Xia XF, Tang WQ, Ke FS, Zheng DD, Hu YL, Song FQ, You YC, Ma XL, Peng L, Zheng YK, Liang Y, Chen YQ, Yu LY, Zhang YN, Liu YY, Li GQ, Lin F, Li JX, Zhou X, Luo YD, Gou CY, Wang JY, Wang J, Yang HM, Wang J, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nature Genet.*, 45(2): 220–225.

Zhan S, Merlin C, Boore JL, Reppert SM, 2011. The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell*, 147(5): 1171–1185.

Zhang TT, Gua SH, Wu KM, Zhang YJ, Guo Y, 2011. Construction and analysis of cDNA libraries from the antennae of male and female cotton bollworms *Helicoverpa armigera* (Hübner) and expression analysis of putative odorant-binding protein genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 407(2): 393–399.

Zhu LM, Ni YP, Cao XY, Huang CX, Cui Q, 2001. A method for artificially rearing to the cotton leafworm *Prodenia litura* Fabricius. *Entomol. Knowl.*, 38(3): 227–228. [朱丽梅, 倪钰萍, 曹晓宇, 黄春霞, 崔勤, 2001. 斜纹夜蛾的人工饲养技术. 昆虫知识, 38(3): 227–228]

（责任编辑：马丽萍）